

BV

## PRODUCTION OF COMPOUND HAVING SIALIC ACID LINKAGE

Patent Number: JP5244976  
Publication date: 1993-09-24  
Inventor(s): IKEUCHI YOSHIHIRO; others: 01  
Applicant(s):: SNOW BRAND MILK PROD CO LTD  
Requested Patent:  JP5244976  
Application Number: JP19920082868 19920304  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C12P19/26 ; C12P21/00  
EC Classification:  
Equivalents: JP3123617B2

### Abstract

**PURPOSE:** To efficiently obtain the subject compound without forming by-products by making neuraminidase act in the presence of a sialic acid-o-glycoside linked form and sialic acid acceptor to transfer the sialic acid to the acceptor.

**CONSTITUTION:** The objective compound can be obtained by making neuraminidase act in the presence of (A) a sialic acid-o-glycoside linked form (e.g. an aromatic cyclic compound having sialic acid and phenolic OH group) and (B) a sialic acid acceptor (e.g. a saccharide selected from oligosaccharides such as monosaccharides and disaccharides, glucolipid consisting of a ganglioside such as asialoganglioside, protein consisting of an asialoglycoprotein) to transfer the sialic acid to the acceptor.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-244976

(43)公開日 平成5年(1993)9月24日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
C 1 2 P 19/26  
21/00識別記号  
7432-4B  
A 8214-4B

F I

技術表示箇所

## 審査請求 未請求 請求項の数7(全5頁)

(21)出願番号 (22)出願日	特願平4-82868 平成4年(1992)3月4日	(71)出願人 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 (72)発明者 池内 義弘 埼玉県狭山市富士見1-10-36 石川マン ション301 (72)発明者 出家 栄記 埼玉県狭山市入間川1-6-6-802 (74)代理人 弁理士 藤野 清也
---------------------	------------------------------	--

(54)【発明の名称】 シアル酸結合を有する化合物の製造法

## (57)【要約】

【構成】 シアル酸のO-グリコシド結合体及びシアル酸受容体の共存下でノイラミニダーゼを作用させてO-グリコシド結合体のシアル酸をシアル酸受容体に転位させてシアル酸結合を有する化合物を製造する方法。

【効果】 シアル酸結合を有する化合物を反応副生成物を生ずることなく効率よく有利に得ることができる。得られるシアル酸結合を有する化合物は生理活性があり、医薬、機能性食品あるいは化学試薬として利用される。

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 シアル酸のO-グリコシド結合体及びシアル酸受容体の共存下で、ノイラミニダーゼを作用させシアル酸をシアル酸受容体に転移させることを特徴とするシアル酸結合を有する化合物の製造法。

【請求項2】 シアル酸受容体が、糖類、糖脂質類、及びタンパク質類からなる群から選択された化合物である請求項1記載の製造法。

【請求項3】 糖類が、単糖、二糖及び三糖から十糖までのオリゴ糖からなる群から選択された糖類である請求項2記載の製造法。

【請求項4】 糖脂質類が、ガングリオシド類である請求項2記載の製造法。

【請求項5】 ガングリオシド類が、アシアロガングリオシド、モノガングリオシド及びポリガングリオシドからなる群から選択されたガングリオシド類である請求項4記載の製造法。

【請求項6】 タンパク質類がアシアロ糖タンパク質である請求項2記載の製造法。

【請求項7】 シアル酸のO-グリコシド結合体が、シアル酸と次のi)~vi)のいずれかの化合物との結合体である請求項1記載の製造法。

i) フェノール性水酸基を有する芳香族環式化合物。

ii) 水酸基を有するヘテロ環化合物。

iii) アルキルアルコール性水酸基を有する化合物。

iv) 単糖あるいは二糖以上のオリゴ糖質。

v) 複合糖質鍵を有する化合物。

及び

vi) コロミン酸。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ノイラミニダーゼの転移反応を利用してシアル酸結合を有する化合物を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術と問題点】 シアル酸は複合糖質鍵の非還元末端に通常見いだされる酸性糖質である。その骨格は、ノイラミン酸のN-アセチル体あるいはN-グリコリル体であり、その他に骨格の水酸基の内1カ所~数カ所がO-アセチル化されたものも十数種見いだされており、現在シアル酸と音うと、これら誘導体の総称とされている。シアル酸結合化合物としては、糖タンパク質あるいは糖脂質等の複合糖質が知られており、これらものは、糖鎖にシアル酸が付加することによって、細胞間認識や生体防御機構、異物認識の際に重要な役割を担っていることが知られている。また、シアル酸には、この他にも、インフルエンザウイルスのレセプター活性や、糖鎖含有血中成分の血中半減期の制御等の活性が知られており、近年益々研究が盛んになってきている。

【0003】 これらシアル酸を有する化合物を得る方法

としては、天然物を精製するのが最も一般的である。しかしながら、天然のシアル酸結合化合物の精製には非常なる困難を伴う。これは、シアル酸の結合様式 ( $\alpha$ -グリコシド結合) が、分離の際の条件、特に酸性条件下において不安定であること、シアル酸のO-アセチル基が、アルカリ条件下においても不安定であること等に起因している。また、シアル酸結合化合物の良好な原材料として知られている、牛脳、人乳、人血等は、入手量にもかなりの制約を受ける。また、有機化学的手法を用いた合成研究も行われているが、多段階の複雑な工程を要する上、合成の過程で生成する副生成物、例えば、目的としない $\alpha$ -グリコシド体あるいは $\beta$ -グリコシド体等の除去が、困難であり、かつ目的物の収率も非常に低いという問題がある。シアル酸ヌクレオチド (CMP-シアル酸) とシアル酸転移酵素を用いる方法も提唱されているが、双方の原料ともに高価であったりあるいは入手困難であったりする。このように、シアル酸結合化合物を容易に且つ安価に調製することは従来の技術では困難であった。

【0004】 一方、ノイラミニダーゼの機能としては、従来、シアル酸結合化合物、すなわち、シアロ糖蛋白質、シアロオリゴ糖、ガングリオシド等から、加水分解反応によりシアル酸を遊離することのみが知られていたが、近年、ある条件下で、この加水分解反応の逆反応をも触媒することが見いだされた。この知見をもとに、加水分解の逆反応によってシアル酸結合化合物を合成するという報告がある (公開特許公報 平3-151891)。しかし、ノイラミニダーゼが、シアル酸結合化合物を加水分解する際に、他の化合物へシアル酸を転移する性質を持つという報告は未だになされていない。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、かかる状況に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、容易に調製できる、シアル酸のO-グリコシド結合体と、シアル酸受容体を含む溶液にノイラミニダーゼを作用させることにより、O-グリコシド結合体からシアル酸受容体にシアル酸が転移して、目的のシアル酸結合体を合成することができるることを初めて見いだした。この知見によると、シアル酸のO-グリコシド結合体がノイラミニダーゼによって加水分解を受ける際に、結合の開裂によって生成するエネルギーが、同時にシアル酸とシアル酸受容体との新たな結合の生成に転用されるため、非常に効率よくシアル酸の転移が進行する。

【0006】 シアル酸供給源として用いるO-グリコシド結合体は、天然界から公知の方法で精製されたるもののが使用できるし、また、それが精製途中のものであっても、あるいは粗製のものであっても、使用可能であることを見いだした。すなわち、この方法では、天然には遊離の形ではほとんど存在しないシアル酸を遊離させ、その後に精製して純品にすることになる。

る。

【0007】遊離のシアル酸が容易に入手可能な場合は、このO-グリコシド結合体は良く知られた方法で、簡便には1段階で合成でき、通常は精製途中でも使用可能であることも見いだし、さらに、シアル酸にO-グリコシド結合させる化合物をあらかじめ選択することにより、シアル酸受容体やノイラミニダーゼとの親和性をコントロールすることが出来、ひいては、吸率を向上させることが出来ることをも見いだして、本発明を完成了。

【0008】すなわち本発明は、シアル酸供給源としての、シアル酸のO-グリコシド結合体とシアル酸受容体を含む混液に、ノイラミニダーゼを作用させ、ノイラミニダーゼの転移反応を利用することを特徴とするシアル酸含有化合物の製造法にかかる。

【0009】以下に本発明を詳細に説明する。本発明で使用するシアル酸のO-グリコシド結合体（以下、シアル酸供与体という）は、特に限定されないが、天然から公知の方法で精製されるものがそのまま利用できる。たとえば、チーズホエーから精製されるグリコマクロペプチドのほか、ウシ初乳から精製されるシリルラクトースや、変異大腸菌から精製されるコロミン酸等は良いシアル酸供与体となる。これら化合物の純品は原料としてはやや高価なものもあるが、本発明者の知見によると、これら化合物は必ずしも純品である必要はなく、粗製あるいは精製途中のものも使用することができるので、シアル酸供与体としては、原材料の純度、コスト、目的物の付加価値、使用製品において要求される目的物の純度等を考慮して、上記天然物や、以下に述べる簡便な合成物の中から目的に合った原料を選択すれば良い。

【0010】原料として遊離のシアル酸を用いる場合は、公知の方法、すなわち酸触媒によるフィッシャー法によってアルコールあるいはフェノールからO-グリコシド結合体が合成できる（例えば、R. Kubo 等, *Cem. Ber.*, 99, 611(1966)）。触媒に用いる酸については特に限定はされないが、塩化水素等のように反応後速やかに除去できるものや、硫酸等のように二価の金属イオンと塩を作ることで系外に除けるもの、あるいはDowex 50型等の陽イオン交換樹脂を用いると便利である。この方法では原理的に $\alpha$ -グリコシド及び $\beta$ -グリコシドが生成し、また、ノイラミニダーゼは $\alpha$ -グリコシド結合のみを分解する事が知られているが、本発明者の得た知見によると、これらを分離した後に $\alpha$ 体のみを反応に供した場合に比べて、この $\alpha$ -グリコシド体及び $\beta$ -グリコシド体の混合物をそのまま反応に供した場合も、さほど吸率に変化は無いことが見いだされたため、1段階の簡便な操作でシアル酸供与体の合成が完了出来ることがわかった。また、必要があれば、マインドル等の方法を利用して、4段階で吸率良く $\alpha$ -グリコシド体を合成することも出来る（P. Neindl等, *Mh. Chem.*, 96, 802(1966)）。

【0011】本発明におけるシアル酸供与体には、上記したようなシリルラクトースばかりではなく、シアル酸と次のi)~vi)のいずれかの化合物との結合体が用いられる。

i) フェノール性水酸基を有する芳香族環式化合物、ii) 水酸基を有するヘテロ環化合物、iii) アルキルアルコール性水酸基を有する化合物、iv) 単糖あるいは二糖以上のオリゴ糖質、v) 複合糖質鎖を有する化合物及びvi)

10 コロミン酸。

【0012】ノイラミニダーゼに関しては特に限定されないが、例えば、アリストバクター・ウレファシエンス (*Arthrobacter ureafaciens*)、クロストリジウム・ペーフリンゲンス (*Clostridium perfringens*)、ビブリオ・コレラ (*Vibrio cholerae*) 等細菌起源のものなどを用いることができる。

【0013】シアル酸の受容体としては水酸基を保有し、シアル酸を結合出来るものであれば特に限定されない。例えば、糖類であれば、ガラクトース、ガラクトサミンをはじめとして、グルコース、フコースなどの单糖類、ラクトース、マルトース、キトビオース等の二糖類から、ガラクトシルラクトースなどの三糖類、そして、それ以上のオリゴ糖にも広く利用できるし、また、例えば、糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質をそのまま用いてその糖鎖部分にシアル酸を付与することもできる。この應用いる複合糖質にも特に制限は無いが、例えば、糖タンパク質であれば、アシアロムチンやアシアロラクトフェリンなどのアシアロ糖タンパク質が挙げられる。ここで、アシアロとは、シアル酸結合化合物からシアル酸が除かれたものであることを表す接頭語である。糖脂質においても特に限定はされないが、アシアロガングリオシド、ガングリオシドのほか、グルコシルセラミド、ガラクトシルセラミド等の中性糖脂質も使用できる。

【0014】また、シアル酸受容体の純度も、調製したシアル酸結合化合物の利用目的によっては、要求されない場合がある。例えばレンネットチーズホエーの濃縮液から、シリルラクトースを調製する場合に本発明を利用すると、このレンネットチーズホエー濃縮液には、シアル酸供与体としてはシアル酸結合糖鎖を持つグリコマ

40 クロペプチドが十分量含まれているし、シアル酸受容体のラクトースはほぼ固形分の70%を占めているので、本発明者の知見によれば、pHを調整後ノイラミニダーゼを添加するだけで反応が行える。反応終了後、シリルラクトースを精製してもよいが、本品の調製の目的が、例えばシリルラクトースを強化したペットフードや食品である場合には、精製を行う必要がない。

【0015】本発明の転移反応は、シアル酸供与体とシアル酸受容体を含む溶液に、ノイラミニダーゼを加えて行われる。シアル酸供与体とシアル酸受容体の濃度は、50 それぞれ0.1容量%から飽和量まで広い範囲で選択さ

れる。通常はシアル酸受容体の濃度を飽和に近づける方が効率が良く好ましいが、それ以下の濃度でも差し支えはない。

【0016】シアル酸受容体として複合糖質を用いる際には、糖鎖以外の、タンパク質や脂質部分が疎水性のため、溶解度の小さい場合がある。この場合には、反応液に有機溶媒を加えたり、界面活性剤を加えることによって収率が向上する。添加する有機溶媒に特に制限は無いが、例えば、ジエチルエーテルやジオキサンのようなエーテル類、アセトン等のケトン類、酢酸エチルなどのエステル類、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、メタノール、エタノール等の低級アルコール類等の他、ジメチルフォルムアミド、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。界面活性剤にも特に制限は無いが、例えば、タウロデオキシコール酸等の胆汁酸系のものや、ドデシル硫酸ナトリウム、脂肪酸ナトリウム等のイオン性のもの、またはトリトンX-100のような非イオン性のもの等が挙げられる。これらの添加量にも特に制限はないが、有機溶媒は、通常反応液1mlに対し、0.1～3.5ml程度を添加する。界面活性剤を用いる場合は、反応液に対し、0.01～10重量%になるよう添加する。

【0017】また、硫酸アンモニウムを0.05～5.0重量%になるように添加することにより、反応を効率よく進行させ得ることがある。この他、シアル酸供与体においてシアル酸と結合する化合物を選択することによっても反応の収率を向上させることができる。すなわち、使用するノイラミニダーゼ自身及び、活性中心近傍の疎水性、反応液の疎水性、イオン強度並びにシアル酸受容体の疎水性を考慮して、シアル酸と結合する化合物の疎水性やかさ高さを適宜選択して用いることにより、シアル酸供与体の、反応液や酵素、ならびに受容体への親和性が向上し、反応の収率を向上できるのが本発明の大きな利点である。

【0018】O-グリコシド結合体は前述の方法で容易に合成出来るが、前記目的の為にシアル酸と結合させる化合物を選択するのが有利である。シアル酸と結合させる化合物は特に限定されないが、例えばメタノール、エタノール等の低級アルコール類等に代表されるアルキルアルコール基を分子内に有する化合物や、フェノール、ナフトール誘導体等のように分子内にフェノール性水酸基を持つ化合物の中から置換基の極性やかさ高さを考慮して適宜選択すると、収率の向上につながる。

【0019】反応液に使用する緩衝液は、pHが3～11程度のものであれば特に制限は無く、公知のものが使用できる。濃度も特に制限は無いが、通常10～500mMの範囲で使用する。ノイラミニダーゼの使用量は、反応液1ml当たり通常0.001～100Uの間で適宜選択する。ここで、ノイラミニダーゼの1単位(1U)とは、シアリルラクトースから1分間に1マイクロ

モルのN-アセチルノイラミン酸を遊離する酵素量とする。反応温度は、通常25℃～55℃で行われる。

【0020】本発明の方法によって調製されたシアル酸結合を有する化合物は、公知の方法、例えばシリカゲルカラムクロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、グルロ過カラムクロマトグラフィー等によって精製できる。また、前述のように、さほど精製を必要としない場合はそのまま使用することができる。このように、本発明においては、ノイラミニダーゼの転移反応によって、効率よくシアル酸含有化合物を合成できる。以下に実施例を挙げて、本発明を更に詳しく説明する。

【0021】

【実施例】

実施例1

(1) シアル酸メチルグリコシドの調製

1リットルの脱水メタノールにシアル酸50gを懸濁し、攪拌しつつ49gの濃硫酸を適下した。反応液を5時間加熱還流した後氷冷し、攪拌しつつ1Nの水酸化バリウム溶液を適下して反応液のpHを1.0に調整し、室温にてさらに1時間攪拌した。1Nの硫酸でpHを1.5に調整した後少量の活性炭を上澄みが脱色されるまで、攪拌しながら加えた。生じた硫酸バリウムと活性炭を濾別除去し、濾液を少量まで減圧濃縮し、冷所に静置すると、目的のシアル酸メチルグリコシド49.5gが白色針状結晶として得られた。この結晶にはα-グリコシドとβ-グリコシドが3:2の比で含まれていた。

【0022】(2) シアリルラクトースの調製

実施例1の方法で調製したシアル酸メチルグリコシド2.0gを、10mlの脱イオン水に懸濁し、氷冷しつつ1N-NaOHを適下してpHを5.0に調整した。この時点で、結晶は完全に溶解して均一な溶液になった。この溶液をラクトースの35重量%溶液100gに加え、さらに、1M-酢酸緩衝液(pH5.0)10ml及びジメチルスルホキシド15mlを加えた。これにノイラミニダーゼ40Uを加え、37℃で15時間反応させた後100℃で5分間加熱処理して反応を停止させた。不溶部を濾別除去した反応液に対して、ダウケミカル社製Dowex 1×4(磷酸型)カラムによるイオン交換クロマトグラフィーを行い、シアル酸、シアル酸メチルグリコシド、及び新たな生成物の3つの画分を得た。新たな生成物の画分を凍結乾燥し、白色粉末890mgを得た。この粉末をノイラミニダーゼで分解し、下記の条件で薄層クロマトグラフィーを行った。

薄層プレート：メルク社製HPTLCプレート

展開溶媒：D-ブロバノール：濃アンモニア水：

水=120:2.5:57.5

発色試薬：レゾルシン塩酸試薬

【0023】分解産物からは、標準品のラクトースとシアル酸にそれぞれRf値が一致する2つのスポットが検

7

出された。分解産物と、ラクトース及びシアル酸の標準溶液とを同時に展開し、デンシトメトリーによる比較定量を行うことにより、分解産物にはシアル酸とラクトースが1:1のモル比で含まれていることがわかった。さらに、分解産物中のシアル酸量をチオバルビツール酸法で、ラクトース量をペリンガー・マンハイム山之内(株)社製の酵素法によるラクトース測定キットで測定しても、同様にシアル酸とラクトースのモル比は1:1であった。なお、分解前の粉末には遊離のシアル酸及び遊離のラクトースは含まれていなかった。以上の結果から、得られた白色粉末がシアリルラクトースであることが確認された。純度は9.8%であった。

## 【0024】実施例2

## (1) シアル酸ベンジルグリコシドの調製

メタノールの代わりにベンジルアルコールを使用する以外は実施例1と全く同じ操作で、シアル酸ベンジルグリコシドを白色針状結晶として得た。この結晶には $\alpha$ -グリコシドと $\beta$ -グリコシドが3:2の比で含まれていた。

【0025】(2) ガングリオシドアナログの調製  
実施例2で調製したシアル酸ベンジルグリコシド1.5gを実施例1(2)と同様に3mlの脱イオン水に懸濁し、1N-NaOHでpHを6.0に調整して基質を溶解した。これとは別に、牛乳由来のグルコシルセラミド(Glc $\beta$ 1→1Cer)0.5gを、2%ードデシル硫酸ナトリウム溶液5.0mlに懸濁し、1.00mM-酢酸緩衝液(pH6.0)4.0mlを加え、さらに1.0mlのジオキサンを加えて均一な溶液とした。攪拌下で両溶液を混合し、ノイラミニダーゼ20Uを加えて37℃で20時間反応させた後100℃で5分間加熱処理して酵素反応を停止させた。反応液を濃縮乾燥し、クロロホルム-メタノール(1/1)で抽出し、ファルマシア社製DEAE-Sephadex A-25(酢酸型)カラム

8

\*ラムによるイオン交換クロマトグラフィーによって、反応物を単離し、脱塩後凍結乾燥を行って、白色粉末1.16mgを得た。この粉末をノイラミニダーゼで分解し、下記の条件で薄層クロマトグラフィーを行った。

薄層プレート：メルク社製HPTLCプレート

展開溶媒：クロロホルム：メタノール：水=60:35:8

発色試薬：レゾルシン塩酸試薬

【0026】デンシトメトリーによる定量によると、この分解物には、シアル酸と、原料のグルコシルセラミドが1:1のモル比で含まれていた。白色粉末を酸分解した後実施例2と同様に糖組成を分析すると、この分解物には、シアル酸とグルコースが1:1のモル比で含まれていた。(グルコース含量は、和光純薬(株)製の酵素法によるグルコース測定キットで測定した。)このことから、生成物は、ガングリオシドのアナログ体である、シアリルグルコシルセラミドであることが確認された。純度は9.7%であった。

## 【0027】実施例3

20 シアリルラクトース含量を増量したホエー粉の調製  
1リットルのレンネットチーズホエー濃縮液(pH5.0, 4.0 Br1x)に、ノイラミニダーゼ40Uを加え、20時間反応させた後pHを7.0に調整し80℃で10分間加熱処理して反応を停止させた。反応液を凍結乾燥して、調製粉450gを得た。また、同一の濃縮液1lにあらかじめ失活したノイラミニダーゼを加えて、同一の操作を行って得た対照粉、及び原料液をそのまま凍結乾燥した原料粉も調製した。これらの粉末の固形あたりのシアリルラクトース量を比較した。(表1参照)

## 【0028】

## 【表1】

	原料粉	対照粉	調製粉
シアリルラクトース量 (mg/100g粉)	55.1	57.3	122.7

調製粉では、原料粉、対照粉に比べて、シアリルラクトース量が2倍以上に増加していた。